

Sur la taxinomie infragénérique du genre *Phragmipedium* (Orchidaceae)¹

Guy R. Chiron^a, Hélène N. Chiron^b & Guido J. Braem^c

Mots clés : analyse moléculaire, Orchidaceae, *Phragmipedium*, phylogénie.

Résumé

Sur la base de l'analyse moléculaire des régions ITS1-5.8rDNA-ITS2 de plusieurs espèces de *Phragmipedium*, les auteurs confirment l'organisation infragénérique du genre, notamment la pertinence de la section *Schluckebieria* Braem.

Abstract

Based on the molecular analysis of the ITS1-5.8rDNA-ITS2 region from several *Phragmipedium* species, the authors confirm the infrageneric organisation of the genus, especially the relevance of the section *Schluckebieria* Braem.

Introduction

Suite à l'apparition de *Phragmipedium kovachii* dans la littérature et sur le marché international, la question de la position taxinomique de la nouvelle plante s'est posée de manière aiguë. Atwood, Dalström & Fernandez (2002) ont placé le nouveau *Phragmipedium* dans la section *Micropetalum* (Hallier f.) Garay². Dans un article plus ou moins élaboré, Braem (2004) a discuté les événements entourant la découverte et la description de la plante et a clarifié sa position systématique dans le genre sur des critères alpha-taxinomiques. Il décida que les différences entre *Phragmipedium kovachii* et les plantes constituant jusqu'alors la section *Micropetalum* (voir encadré ci-

1 : manuscrit reçu le 21 juin 2006, accepté le 2 août 2006.

2 : in *Orchid Digest*, 43 (4): 133-179 (1979)

après) justifiaient la création d'une section distincte, *Schluckebieria*, pour accueillir le nouveau taxon. Conscient que cette décision inspirerait des questions, Braem proposait alors de réaliser une étude moléculaire sur les espèces de la section *Phragmipedium* section *Micropetalum* et *Phragmipedium kovachii* pour voir si cette méthode confirmerait ou non son interprétation des informations morphologiques. A cette même occasion, il suggérait, à la lumière de ses travaux sur les *Phragmipedium* en général, d'inclure dans ladite étude quelques autres espèces.

Matériel et méthode

Matériel végétal

L'identification des plantes dont proviennent les échantillons végétaux a été vérifiée quand ces plantes étaient en fleur. Des morceaux de feuilles de l'ordre de 0,5 gramme ont été prélevés sur les plantes vivantes et placés, frais, au congélateur, dans des conditionnements stériles dûment étiquetés.

Pour *Phragmipedium exstaminodium*, un échantillon de feuille d'une plante récompensée aux Etats-Unis et un autre échantillon prélevé sur une plante poussant dans la localité type ont été choisis.

Dans le cas de *Phragmipedium kovachii*, deux échantillons de matériel foliaire ont été obtenus, l'un directement du Pérou, l'autre provenant d'une culture en Europe Centrale.

Les plantes de *Phragmipedium* section *Phragmipedium*, telles que considérées dans cette étude, ont été identifiées en accord avec Braem & Ohlund (2004a, 2004b, 2005) et Braem, Ohlund & Quéné (2004a, 2004b, 2005).

Trois plantes différentes ont été utilisées pour *Phragmipedium besseae* : l'une originaire du Pérou (*besseae* #1), une autre d'Equateur (*besseae* #2), la troisième (*besseae* #3) étant la forme *flavum*.

Nous avons également prévu d'échantillonner deux plantes différentes de *Phragmipedium schlimii*.

L'hybride #1 est le résultat du croisement entre *Phragmipedium fischeri* et *Phragmipedium schlimii* réalisé à Orchids Limited (Plymouth, MN, USA) sous la direction de Jerry Lee Fischer auquel nous sommes redevables, pour le matériel foliaire.

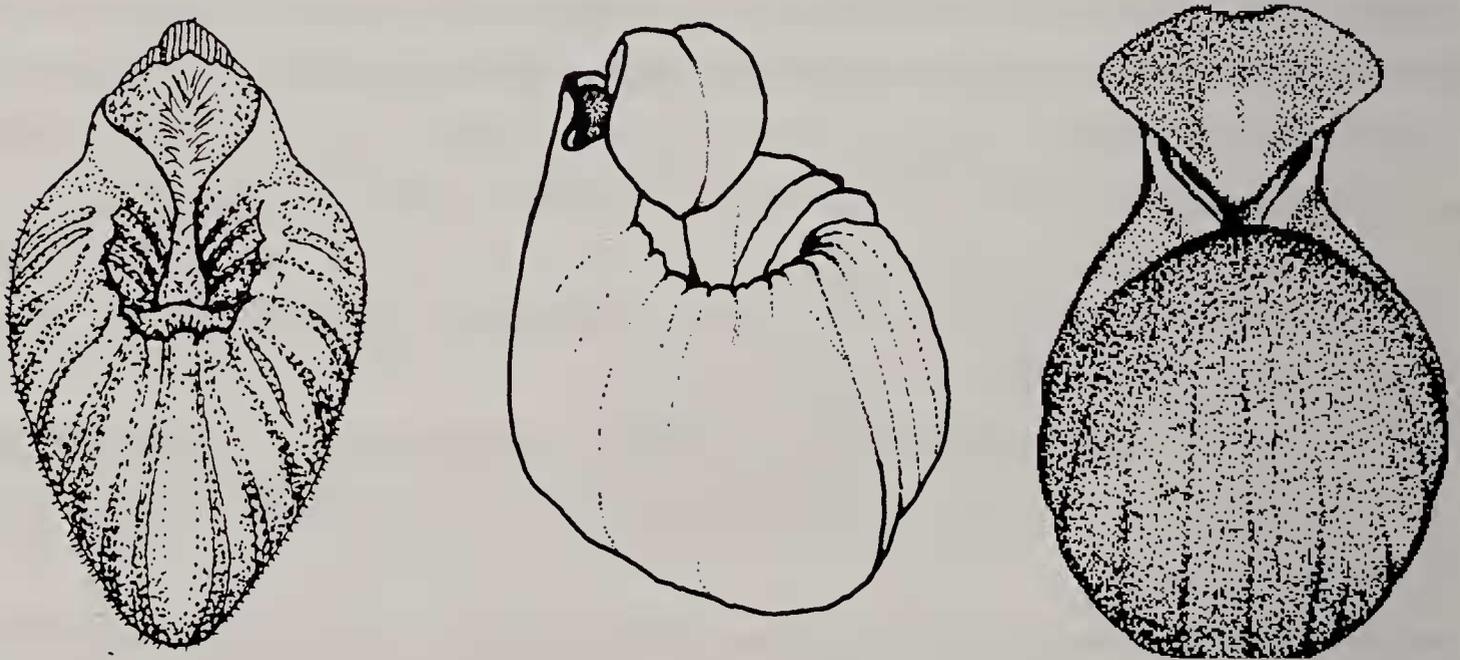
Phragmipedium tetzlaffianum est généralement considéré comme un hybride complexe identique à *Phragmipedium* Simon Marcotte – enregistré par J. Marcotte en 1993.

Différences morphologiques entre *Phragmipedium kovachii* et les plantes de la section *Micropetalum* :

1- les fleurs de *P. kovachii* sont au moins 4 fois plus grandes que celles des espèces de la section *Micropetalum* ;

2- *P. kovachii* n'a pas de « fenêtres » sur le sabot ;

3- la forme du labelle et la position du staminode montrent que *P. kovachii* appartient à un syndrome de pollinisation tout à fait différent ; la forme du labelle (voir figure) est plus proche de celle que l'on observe chez les plantes des sections *Phragmipedium* et *Himantopetalum*. La transition entre les lobes latéraux et le lobe principal (sabot) forme un isthme distinct chez *P. kovachii*, alors qu'elle est continue chez les espèces de la section *Micropetalum*.



Formes des labelles de *P. besseae*, *P. schlimii* et *P. kovachii*

dessins Pastorelli, G. Chiron et S. Dalström, respectivement (de gauche à droite)
extraits de Braem (2004), avec l'aimable autorisation de l'éditeur

Notre intention initiale était de prendre un *Selenipedium* (*S. aequinoctiale*) pour groupe externe, mais nous n'avons pas réussi à amplifier la région ITS1-5.8rDNA-ITS2 pour cet échantillon avec les amorces choisies (voir plus bas). Nous avons donc retenu finalement *Paphiopedilum micranthum*.

Pour quelques espèces, il s'est avéré très difficile de se procurer du matériel foliaire de sources fiables. L'interprétation excessive des réglementations relatives à la conservation de la nature rend difficile l'obtention de matériel frais prélevé sur des plantes sauvages. Dans la plupart des cas³, des plantes bien identifiées étaient en culture, soit en Europe, soit aux Etats-Unis.

Malgré le conditionnement susceptible de placer nos échantillons hors de l'application de la CITES et bien que cette convention prévoie explicitement l'exemption pour les travaux scientifiques, nous choisissons de ne donner ici aucun autre détail sur la provenance du matériel végétal afin de protéger nos sources. La totalité de ce matériel est parvenue au laboratoire en mars 2005 et l'analyse moléculaire réalisée en juillet de la même année.

Analyse moléculaire

Les techniques moléculaires mises en oeuvre pour le séquençage comprennent, classiquement, trois phases successives : extraction d'ADN, amplification de la région utile, séquençage proprement dit.

L'ADN génomique a été extrait à partir de 50-80 mg de tissu foliaire congelé et broyé, à l'aide du Kit de Purification d'ADN génomique WIZARD[®] (Promega) en présence d'azote liquide et selon les recommandations du fabricant. Après précipitation, le culot d'ADN est resuspendu dans 100 µl d'H₂O distillée stérile.

La région ITS1-5.8rDNA-ITS2 a été amplifiée par réaction de polymérase en chaîne (PCR) dans un volume total de 50 µl, en présence de 1 µl d'ADN génomique, 2,5 unités de polymérase PfuTurbo[®] (Stratagene) et 100 ng de chaque amorce oligonucléotidique : une amorce sens (ITS1fw) se fixant sur la région 5' de la séquence ITS1 (5'-CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3') et une amorce antisens (ITS2rv) se fixant sur la région 3' de la séquence ITS2 (5'-GGTTGCCTCACCTGACCTG-3'). Ces deux amorces ont été construites à partir de l'alignement des régions ITS1-5.8rDNA-ITS2 de quelques espèces déjà publiées. Les conditions PCR ont été les suivantes : 30 cycles de 1 min de dénaturation (94°C), 1 min d'hybridation (58°C), 1 min 30 sec d'élongation (72°C), suivis de 30 min additionnelles d'élongation à 72°C en présence de 0,75 unité de polymérase Taq (Promega). Le produit d'amplification (fragment d'environ 0,7 kb) a été purifié sur gel d'agarose

3: *Phragmipedium besseae*, *caudatum*, *dalessandroi*, *exstaminodium*, *fischeri*, *longifolium*, *pearcei*, *popowii*, *richteri*, *schlimii*, *warszewickzianum* et *Paphiopedilum micranthum*.

(Kit d'Extraction sur Gel QIAquick, Qiagen), puis ligué dans le vecteur pGEM-T easy (Promega).

La séquence ITS1-5.8rDNA-ITS2 de chaque taxon a été déterminée par séquençage des deux brins complémentaires d'ADN à partir d'au moins trois clones indépendants.

Les réactions de séquençage ont été réalisées par la méthode de terminaison d'extension de chaîne (Sanger *et al.*, 1977) en présence de didéoxynucléotides marqués chacun par un fluorochrome différent (BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems), à l'aide d'un robot Genesis Workstation 150 (Tecan). Les électrophorèses ont été réalisées sur capillaires de 80 cm (3100 Capillary Array, Applied Biosystems) en utilisant le séquenceur 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Traitement

Les séquences obtenues ont une longueur de 750 ± 2 sites, à l'exception de *P. richteri* (563 sites) et *P. longifolium* var. *roezlii* (427 sites). Elles ont été alignées à l'aide du logiciel CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), disponible notamment sur le site Internet du Pôle BioInformatique Lyonnais. Nous avons conservé aux paramètres leurs valeurs par défaut. La longueur totale de l'alignement (sans compter les deux séquences courtes) est de 785 sites, dont 407 identiques sur les 21 séquences ; 378 sites sont informatifs sur le plan de la phylogénie. Pour les seules espèces du genre *Phragmipedium*, le nombre de sites variables est de 288.

Les séquences alignées ont été fournies comme données d'entrée au groupe de logiciels PHYLIP (Phylogeny Inference Package) mis à disposition par l'Université de Washington, Seattle, USA (Felsenstein, 1989, 1993). Nous avons adopté la version 3.6 et successivement utilisé :

- SEQBOOT (Boot-strapped sequences algorithm) : ce logiciel permet de créer, à partir d'un jeu de séquences d'entrée, N jeux de séquences de même longueur obtenus par échantillonnage aléatoire de la séquence d'entrée. Nous avons choisi N=100. Cette opération permet ensuite de réaliser le test dit du *bootstrap*, qui évalue la fiabilité des branches de l'arbre phylogénétique obtenu *in fine*.

- DNAPARS (DNA parsimony algorithm) : ce programme réalise un algorithme de parcimonie analogue à la parcimonie de Wagner sur des séquences d'ADN. Les hypothèses de base pour cette méthode sont

classiques : (1) chaque site évolue indépendamment ; (2) les différentes lignées évoluent indépendamment ; (3) la probabilité de substitution d'une base sur un site donné est faible sur la période de temps concernée par une branche ; (4) les quantités de changements attendues le long de différentes branches ne varient pas au point que la probabilité de deux changements dans une branche à fort taux de changement soit plus grande que la probabilité d'un changement dans une branche à faible taux ; (5) les quantités de changements ne varient pas d'un site à l'autre au point que la probabilité de deux changements sur un site soit plus grande que la probabilité d'un changement sur un autre.

Ce programme fournit en sortie un ou plusieurs arbres de plus grande parcimonie, en précisant la longueur de chaque branche.

- CONSENSE (Majority-rule and strict consensus tree-program) : ce programme construit, à partir des arbres les plus parcimonieux obtenus en sortie de DNAPARS pour les N jeux de séquences, un arbre consensus qui contient les groupes monophylétiques qui apparaissent le plus souvent dans les arbres d'entrée. Il inscrit, à chaque embranchement, un nombre représentant le nombre de fois que le groupe d'espèces situé à droite de l'embranchement apparaît. Avec le choix fait plus haut de prendre N=100, ce nombre se lit comme un pourcentage d'occurrence.

Il est possible d'enraciner arbitrairement l'arbre obtenu en désignant, parmi les espèces étudiées, celle qui sera placée à la racine (ici, bien entendu, nous avons choisi *Paphiopedilum micranthum*).

Un premier traitement a été effectué en prenant les séquences entières, afin d'obtenir les nombres de changements le long de chaque branche. Pour éviter un regroupement artificiel de *Phragmipedium richteri* et *P. longifolium* var. *roezlii*, nous avons cherché l'arbre consensus semi-strict en utilisant des séquences partielles obtenues en éliminant les 321 premiers sites. C'est ainsi qu'a été obtenu l'arbre présenté ci-dessous (page 213). Les longueurs de branches indiquées sont, quant à elles, obtenues avec les séquences complètes. L'indice de cohérence CI égale 0,74.

Résultats et discussion

L'arbre phylogénétique représenté sur la figure 1 montre plusieurs clades distincts et fortement soutenus par les valeurs de *bootstrap*. D'une manière générale il est similaire à celui publié par Loayza, Williams & Whitten

(2005), bien que les espèces mises en œuvre par ces auteurs ne soient pas exactement les mêmes que dans le présent travail.

- Le clade [*Phragmipedium schlimii*, *P. fischeri*, leur hybride, *P. dalessandroi*, *P. besseae*] est soutenu par une valeur de bootstrap de 100% ; il représente la section *Micropetalum* ; les longueurs de branche à l'intérieur du clade sont généralement faibles, tandis que la branche aboutissant à l'ancêtre commun de la section (espèce A) comporte 10 changements.

- La paire représentant *Phragmipedium kovachii* forme un groupe frère du clade précédent ; la distance entre leur ancêtre commun (espèce B, soutenue par un bootstrap de 99%) et *P. kovachii* est de 11 changements. La simple observation de telles longueurs de branches suffit à considérer *P. kovachii* comme espèce sœur de la section *Micropetalum* et non comme partie intégrante de ladite section. Contrairement aux résultats obtenus par Loayza, Williams & Whitten (2005), les nôtres confirment qu'il est préférable de placer *P. kovachii* à l'extérieur de ladite section, comme le suggèrent les caractères morphologiques (voir Braem, 2004), même si cela n'est pas strictement nécessaire pour conserver à la section son caractère monophylétique.

- Le clade [*Phragmipedium exstaminodium*, *P. warszewiczianum*, *P. caudatum*, *P. popowii*] est également soutenu par un bootstrap de 100% : il correspond à la section *Phragmipedium*.

- Le clade formé par *Phragmipedium pearcei* et *P. richteri* (membres de la section *Himantopetalum*) et *P. longifolium* var. *roezlii* (membre de la section *Lorifolia*) n'est que très faiblement soutenu (bootstrap < 50%) bien que ces deux sections soient sœurs dans le phylogramme de Loayza, Williams & Whitten (2005). Notons que *P. pearcei* et *P. richteri*, quoique membres de la même section, ne sont pas directement regroupés dans ce clade.

- Le clade constitué des espèces de la section *Phragmipedium* et des trois espèces ci-dessus est soutenu par une valeur relativement basse de bootstrap (73%), mais correspond (à ceci près que nous n'avons dans notre étude aucun représentant de la section *Platypetalum*) à un clade présent dans le travail de Loayza *et al.* (*opus cit.*), là aussi en position de clade frère du groupe [section *Micropetalum*, section *Schluckebieria*].

- On obtient enfin un dernier clade, formé de *P. longifolium* var. *gracile* et *P. tetzlaffianum*, clade soutenu par une valeur de bootstrap de 99%. Les

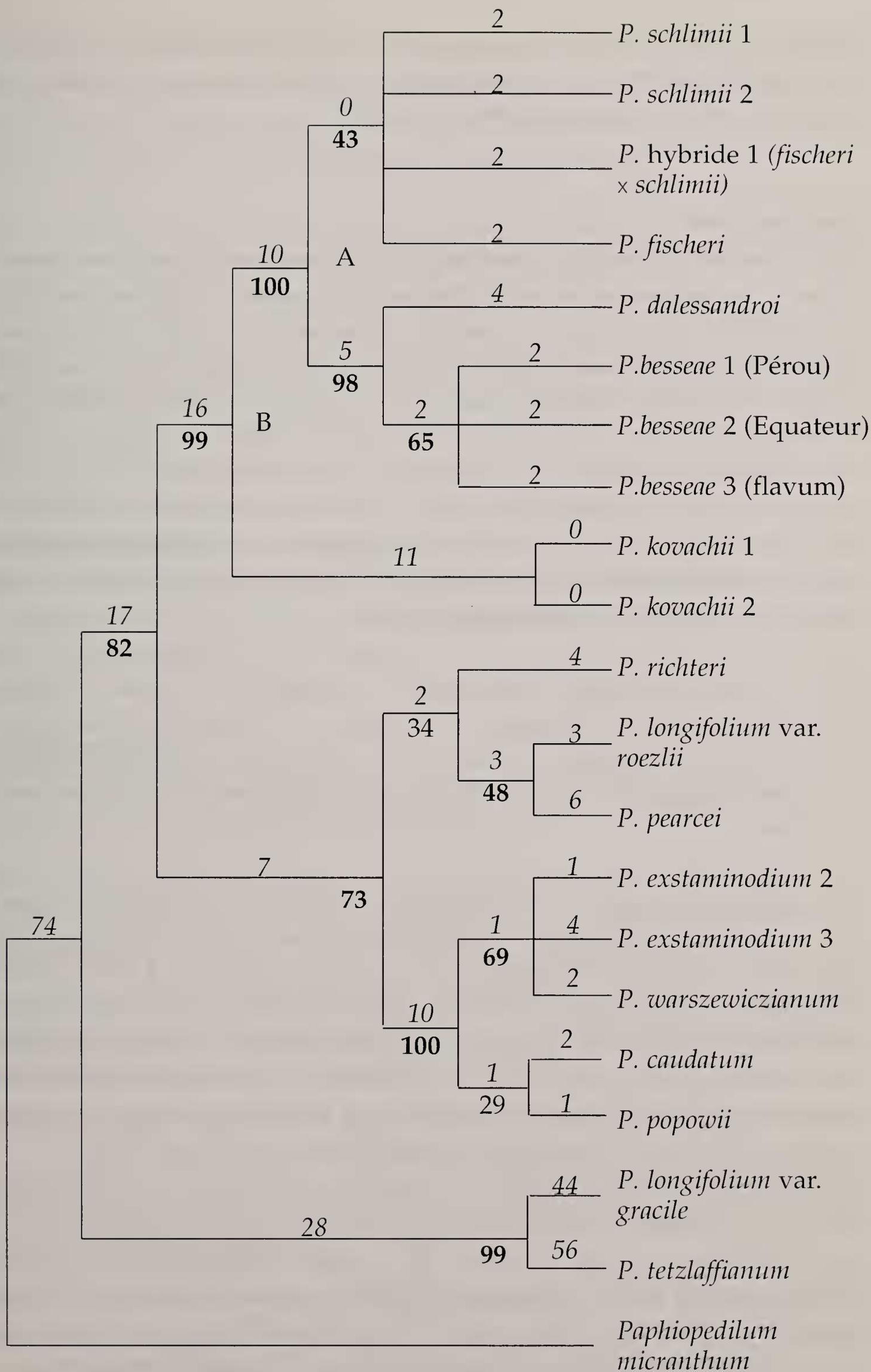


Fig. 1 : arbre phylogénétique consensus semi-strict

longueurs de branches qui mènent à ces deux espèces sont fortes (respectivement 44 et 56 changements), ce qui montrent qu'elles sont malgré tout très différentes l'une de l'autre.

Conclusions

1-Les résultats de notre étude moléculaire montrent clairement que la section *Micropetalum* doit être limitée aux espèces à petites fleurs. Ils montrent en effet que la section *Schluckebieria*, certes étroitement apparentée aux plantes de la section *Micropetalum*, mérite d'être considérée comme une entité autonome du niveau de section. Nous sommes bien évidemment d'accord avec Loayza *et al.* (*op. cit.*) quand ils disent qu'il n'est pas strictement nécessaire de séparer les deux sections, mais alors il n'y a non plus aucune nécessité pour 90% des décisions prises en matière de taxinomie végétale. Si l'on considère la nécessité comme une condition *sine qua non*, *P. schlimii* et *P. fischeri* devraient être une seule et même entité, de même que *P. besseae* et *P. dalessandroi*.

2-Nos résultats montrent également de manière nette que la section *Phragmipedium* est clairement délimitée. Là encore, si l'on suit le raisonnement des auteurs ci-dessus sur le principe de nécessité, la section toute entière pourrait être réduite à une seule espèce, *Phragmipedium caudatum*.

3-Le « clade » formé par *P. longifolium* var. *gracile* et *P. tetzlaffianum* est peut-être un simple artefact de l'algorithme de parcimonie utilisé. Les 100 différences de bases observées sur la courte séquence d'ADN étudiée inciteraient à penser que ces deux espèces sont groupées davantage en fonction de leur écart par rapport aux autres espèces étudiées qu'en raison d'une réelle parenté entre elles. *P. longifolium* var. *gracile* est depuis des années une énigme taxinomique tandis que *P. tetzlaffianum* est un hybride complexe, décrit par erreur dans la même section par Gruss (2003).

4-Le regroupement de *P. richteri*, *P. longifolium* var. *roezlii* et *P. pearcei* en un clade très faiblement soutenu, est probablement un autre artefact : on se serait attendu à ce que *P. richteri* et *P. pearcei* apparaissent en position d'espèces sœurs, puisqu'elles sont considérées comme membres de la même section *Himantopetalum* ; même si *P. richteri* (alias *P. topperi*) a toujours été connu comme une entité douteuse. Le fait que *P. longifolium* var. *roezlii* et

P. longifolium var. *gracile*, deux entités généralement considérées comme des variétés de la même espèce appartenant à la section *Lorifolia*, sont séparés donne à penser que l'étude de la seule région prise en compte ici est insuffisante et doit être étendue à d'autres régions de l'ADN.

Pour terminer, nous pouvons dire que les résultats de cette étude confirment pleinement les études alpha-taxinomiques de Braem (2004a, 2004b) et de Braem, Ohlund & Quéné (2004) et la pertinence de la section *Schluckebieria* ; et que la seule prise en compte de la région ITS1-5.8rDNA-ITS2 montre ses limites, déjà soulignées dans Braem (1999) et Braem & Chiron (2003), qui ne peuvent être franchies qu'en étendant l'étude à d'autres régions.

Remerciements

Les auteurs remercient l'équipe Séquençage de la Génopole Montpellier-Languedoc-Roussillon qui a effectué gratuitement les séquençages de régions ITS nécessaires à cette étude.

Bibliographie

- Atwood, Dalström & Fernandez, 2002. *Phragmipedium kovachii*, a new species from Peru. *Selbyana*, 23 (Supplément: 1-3).
- Braem, G.J., 1999. in Braem, Baker & Baker, *The Genus Paphiopedilum - Natural History and Cultivation*, Volume 2 - Botanical Publishers Inc., Kissimmee, USA.
- Braem, G.J., 2004. *Phragmipedium kovachii*, *Schluckebieria* – nouvelle section du genre *Phragmipedium* – et réflexions sur les pratiques taxinomiques. *Richardiana* 4(3) :89-103.
- Braem, G.J. & G. Chiron, 2003. *Paphiopedilum*. Tropicalia (Voreppe, France).
- Braem, G.J. & S. Ohlund, 2004a. Une chausse-trappe linguistique : *Phragmipedium caudatum*, *P. warszewiczianum*, *P. humboldtii*. *Richardiana*, 4(4):163-170.
- Braem, G.J. & S. Ohlund, 2004b. A language trap - *Phragmipedium caudatum*, *Phrag. warszewiczianum*, *Phrag. humboldtii*. *Australian Orchid Review*, 69 (5) : 19-21.

Braem, G.J. & S. Ohlund, 2005. Una trampa lingüística - *Phragmipedium caudatum*, *Phrag. warszewiczianum*, *Phra. humboldtii*. *Orquideología*, 23 (2): 137-145.

Braem, G.J., S. Ohlund & R.J. Quéné, 2004a. Le vrai *Phragmipedium warszewiczianum* pourrait-il se présenter, s'il vous plaît ? Un nouveau cas d'identification erronée – Le complexe *Phragmipedium caudatum*, éclaircissements et description d'une nouvelle espèce. *Richardiana*, 4 (4): 171-196.

Braem, G.J., S. Ohlund & R.J. Quéné, 2004b. Will the real *Phragmipedium warszewiczianum* please stand up? A Clarification of the *Phragmipedium caudatum* complex (*Phragmipedium* section *Phragmipedium*). *Australian Orchid Review*, 69 (6) : 4-15.

Braem, G.J., S. Ohlund & R.J. Quéné, 2005. El Verdadero *Phragmipedium warszewiczianum* - Una clarificación del complejo de *Phragmipedium caudatum*. *Orquideología*, 23 (2): 87-116.

Felsenstein, J., 1989. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5:164-166.

Felsenstein, J., 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distribué par l'auteur, Université de Washington, Seattle (USA) – Department of Genetics.

Gruss, O., 2000. A new species of the genus *Phragmipedium* from South America: *Phragmipedium tetzlaffianum*. *Caesiana*, 15: 33-40.

Loayza, M.D., N.H. Williams & W.M. Whitten, 2005. *Phragmipedium kovachii*. Molecular systematics of a New World orchid. *Orchids*, 74(2):132-137.

Sanger, F., S. Nicklen & A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74:5463.

Thompson, J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22).

a : 2rue des pervenches, F-38340 Voreppe (France). e-mail : g.r.chiron@wanadoo.fr

b : 69 rue Georges Pézières, F-66000 Perpignan (France)

c : Naunheimer Str. 17, D-35633 Lahnau (Allemagne), auteur pour la correspondance